

## Studies on fungal denitrification and co-denitrification

著者	Kim Du Hyun
内容記述	Thesis (Ph.D. in Agriculture)--University of Tsukuba, (A), no. 1198, 1994.3.25
発行年	1994
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/4191">http://hdl.handle.net/2241/4191</a>

氏 名(本 籍)	<sup>きむ</sup> 金 <sup>どう</sup> 斗 <sup>ひよん</sup> 顯 (韓 国)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,198 号
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学位論文題目	STUDIES ON FUNGAL DENITRIFICATION AND CD-DENITRIFICATION (カビの脱窒と共脱窒に関する研究)
主 査	筑波大学教授 理学博士 新 井 勇 治
副 査	筑波大学教授 農学博士 中 原 忠 篤
副 査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副 査	筑波大学教授 農学博士 上 田 堯 夫

## 論 文 の 要 旨

脱窒は地上の物質循環（窒素サイクル）、地球環境の恒常性維持において重要な役割を果たしているが、生理的には嫌気呼吸としての意義を持つ。嫌気呼吸は脱窒以外にも様々な形態が知られているが、全てこれまで原核生物（細菌）に固有の能力と考えられていた。当研究室において、不完全菌 *Fusarium oxysporum* MT-811株に硝酸塩又は亜硝酸塩で誘導されるチトクロム P450（P450）の存在が見いだされていた。P450は通常モノオキシゲナーゼとして働くヘム蛋白の総称であるが、硝酸塩／亜硝酸塩による誘導は全く新しい現象であり、本菌における新規な硝酸塩代謝および本 P450の全く新しい機能が予測されていた。その後この発見がきっかけとなり、真核生物として初めてこの *F. oxysporum* 株に強い脱窒活性が見いだされた。また最近になりこの P450が、カビ脱窒系の最終過程に関わる一酸化窒素還元酵素（Nitric Oxide Reductase）であることが判明し、通称を P450nor と命名された。本 P450はその画期的な性質から、当該分野で世界的な注目を集めている。これら *F. oxysporum* による研究と平行して、本研究では以下のことを行った。

*F. oxysporum* における P450誘導条件の検討を行い、本 P450の誘導剤は硝酸塩及び亜硝酸塩以外には見あたらないことを確認した。本 P450はこのカビにおける新しい硝酸塩代謝に関わることが予想されたので、真菌におけるその分布に興味を持たれた。種々のカビ、酵母を用いて、硝酸塩／亜硝酸塩一誘導型 P450の生産性を調べた。その結果、*F. oxysporum* 以外では *Fusarium lini*, *Gibberella fujikuroi* など *F. oxysporum* とごく近縁のカビにのみ生産が認められた。同じフサリウム属やジベレラ属でも生産しないものもあった。これらのカビの P450は、*F. oxysporum* MT-811株の P450抗体と反応し、またよく似た吸収スペクトルを示したことから、上記 P450nor と類似の蛋白であると結論された。フ

サリウム属は分類が非常に難しく、ヘテロな性質を持つ菌を多数含んでいる。従って本研究により本 P450が、応用微生物学上重要なフサリウム属カビの分類に際し一つの指標となり得ることが示された。

P450nor 生産性に引続き、脱窒活性の分布も調べた。その結果意外にも多数のカビに脱窒素活性が見いだされた。脱窒の主産物は最初の MT-811株同様  $N_2O$  であった、硝酸塩を還元できるものとできないものに分かれた。また、P450nor が検出されないカビも多かった。従ってカビ脱窒菌は硝酸塩の還元性、P450nor 生産性などにより幾つかのタイプに分類された。脱窒菌の多くは子囊菌亜門核菌綱およびそれに関連する不完全菌亜門に属した。しかし不整子囊菌綱に属するものも少数ながら見られ、より広い検索により、さらに多くの脱窒菌が発見される可能性が示された。従来脱窒は細菌（原核生物）しか行わないと信じられてきたが、本研究により初めて多くのカビに脱窒活性が認められ、真核微生物による脱窒が普遍的生命現象であることが明らかとなった。

*Fusarium solani* など幾つかのカビでは亜硝酸塩から 2 原子窒素 ( $N_2$ ) の生成が認められたので、この現象を詳しく調べた。安定同位体  $^{15}N$  により成る亜硝酸塩を基質として GC-MS により反応産物を調べたところ、 $N_2$  の一方の窒素原子は亜硝酸塩由来ではなかった。従って培地中の他の窒素源が  $N_2$  に取り込まれていることが予想された。種々の窒素化合物を検討した結果、アニリン、スルフォアミド、アミノ酸などからは  $N_2$  が、またアザイドやサリチルヒドロキシサム酸 (SHAM) などからは  $N_2O$  が生じた。アニリンなどからの窒素回収率はほぼ 100% であった。類似の現象は脱窒細菌でも知られていたが、細菌の活性は遥かに弱く、従ってこのユニークな現象を共脱窒 (Co-denitrification) と名付けた。共脱窒産物が  $N_2$  か、 $N_2O$  となるかは窒素供与体窒素原子の還元状態に依存する。カビの共脱窒は中性の pH でも起こることや、シアン、アンチマイシン、ロテノンなどの呼吸阻害剤で阻害されることから、pH 低下による化学反応 (ファンスライク反応) ではなく、生理的反応に依ることが示され、また脱窒同様呼吸鎖電子伝達系に共役していることが示唆された。

## 審 査 の 要 旨

本論文の第一の業績は、脱窒真菌（カビ）の分布を調べ、多くの脱窒能をもつ菌を発見したことである。すなわち子囊菌亜門核菌綱および関連不完全菌亜門を中心に多数の脱窒真菌を見だし、カビの脱窒が普遍的生命現象であることを初めて明らかにした。さらに脱窒真菌は、硝酸塩の還元性、P450nor 生産性などにより幾つかのタイプに分類されることを示した。第二として、亜硝酸塩と様々な窒素化合物からハイブリッドの脱窒産物が生じることを発見し、これを共脱窒と命名した。特に 2 原子窒素 ( $N_2$ ) を生じる共脱窒を詳しく調べ、その生理的意義について考察した。第三に P450nor の分布を調べ、その生産性が上記脱窒活性と併せ、分類の困難なフサリウム属の分類の一つの指標になることを明らかにした。

以上、本研究は、従来細菌（原核生物）しか行わないと考えられていた脱窒が真菌にも広く分布することを初めて明らかにし、さらにその諸性質を調べることにより微生物学への重要な貢献を行った。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。